Aus der Medizinischen Universitätsklinik
Direktor: Professor Dr. Stepp

Ueber das Verhalten der Thymonucleinsäure in normalen Geweben

Studien mit der Nuclealreaktion

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung

der Doktorwürde in der Medizin und Chirurgie

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Schlesischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Breslau

vorgelegt von

Erich Balzer
Medizinalpraktikant

Breslau 1931
Druck Anton Schreiber, Breslau

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität Breslau
I. Referent: Privatdozent Dr. Voit
II. " Professor Dr. Stepp

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Ueber das Verhalten der Thymonucleinsäure in normalen Geweben.

Studien mit der Nuclealreaktion.

Die meisten der bisher üblichen histologischen Färbemethoden beruhten auf der Möglichkeit, bestimmte Gewebsarten durch präformierte Farbstoffe elektiv zu färben, sie ließen aber nie absolut sichere Schlüsse zu auf einen in einem Gewebe vorhandenen besonders charakterisierten chemischen Körper. Feulgen und Rossenbeck waren die ersten, denen es gelang, in diesem wenig erforschten Gebiet einen Schritt vorwärts zu kommen. Sie fanden die Nuclealreaktion, die gestattete, wenigstens in einem wichtigen Teil der Zelle, dem Kern, einen bestimmten wohlcharakterisierten Körper mikrochemisch nachzuweisen, nämlich die Thymonucleinsäure. Die Nuclealreaktion beruht auf der Fähigkeit der Thymonucleinsäure, nach milder partieller saurer Hydrolyse unter Abspaltung der beiden Purinderivate Guanin und Adenin reduzierende Gruppen freizumachen, die sich wie echte Aldehydgruppen verhalten und mit fuchsinschwefliger Säure unter Bildung eines blauvioletten Farbstoffs reagieren. Diese Eigenschaft wird dazu benutzt eine „Färbung" anzustellen, die nichts weiter darstellt, als die Anwendung einer chemischen Reaktion, die auch jederzeit im Reagenzglas ausführbar ist, auf mikroskopische Präparate zum Nachweis eines chemisch wohldefinierten Körpers, eben der Tymonucleinsäure. Fehlt im Präparat der chemisch nachzuweisende Körper, so kann es auch nicht zur Reaktion, und damit auch nicht zur Anfärbung kommen, eine Überfärbung ist also unmöglich. Hydrolysiert man ein beliebiges mikroskopisches Präparat in n-Salzsäure bei 60° 4 Minuten lang und behandelt das Präparat nach Auswaschen der Säure $^3/_4$ bis 1 Stunde mit fuchsinschwefliger Säure, so tritt überall da, wo Thymonucleinsäure vorhanden ist eine intensive Violettfärbung auf.

Wir haben mit dieser Methode also einmal einen sehr exakten mikrochemischen Nachweis der Nucleinsäuren vom Typus der Thymonucleinsäure oder, wie wir vielleicht besser sagen, der Nuclealkörper, gleichzeitig aber auch eine äußerst elektive „Kernfärbung", da die Thymonucleinsäure einen typischen Kernbestandteil darstellt und im Protoplasma der Zellen bisher noch nie gefunden wurde. Da nach den Untersuchungen Feulgens und seiner Schüler die Nuclealkörper obligatorisch für Kerne sind, insbesondere bei tierischen Geweben bisher noch keine Kerne angetroffen sind, die anucleal wären, andrerseits im Protoplasma die Reaktion immer negativ ausfällt, so darf man wohl annehmen, daß ein histologisches Element, bei dem die Nuclealreaktion positiv ausfällt, mit dem Zellkern in genetischem Zusammenhang steht.

Die Auswertung der Nuclealfärbung setzt natürlich voraus, daß andere Stoffe, die mit der fuchsinschwefligen Säure unter Farbstoffbildung reagieren (Aldehyde) im beobachteten Objekte fehlen. Nun fanden Feulgen und K. Voit beim Arbeiten mit fuchsinschwefliger Säure in tierischen Geweben eine aldehydartige Substanz von Lipoidcharakter, die sie Plasmalogen nannten, einen Körper, der in Wasser unlöslich und in organischen Lösungsmitteln löslich ist und den Geweben durch Alkohol entzogen werden kann. Durch Säuren oder Sublimat wird es in Plasmal übergeführt. Dieses reagiert als Aldehyd mit fuchsinschwefliger Säure unter Bildung eines violetten Farbstoffs (Plasmalreaktion), und zwar entweder nach längerer Zeit von selbst durch die Wirkung der Säure, oder sofort bei Gegenwart von Sublimat. In letzterem Verhalten beruht auch der Unterschied gegenüber der Nuclealreaktion. Als einziger Gewebsbestandteil, dem es durch Alkohol nicht entzogen werden kann, sind bisher die elastischen Fasern beschrieben worden. (R. Feulgen, K. Voit, Voß.)

Die Nuclealreaktion wurde bisher angewandt zum Nachweis von Kernsubstanzen und um festzustellen, wie weit die Thymonucleinsäure in der Natur verbreitet ist. Feulgen und Rossenbeck fanden die Kerne der Pflanzen nuclealpositiv. Auch in den Bakterien gelang K. Voit der Nachweis der Thymonucleinsäure. Außerdem wird sie immer da Verwendung finden, wo es gilt, Zelleinschlüsse auf ihren genetischen Zusammenhang mit dem Zellkern zu untersuchen. So verhalten sich nach K. Voit die baso-

philen Granula in den Erythrozyten bleivergifteter Kaninchen nuclealnegativ. Auch das Verhalten des menschlichen Blutes der Nuclealfärbung gegenüber wurde eingehend studiert. (K. Voit, K. Voit und Kochmann.) K. Voit und C. Barthels wiesen ferner in einer kürzlich erschienenen Arbeit Gewebstrümmer als echte Kernsubstanzen mittels der Nuclealreaktion nach, Westhues erkannte echte Kernsubstanz in Trümmermassen des Schichtstars. Wenig Anwendung aber fand bisher die Nuclealreaktion zu morphologischen Studien, wohl wegen der berechtigten Befürchtung, daß die Hydrolyse zerstörend auf das Gewebe wirkt, obwohl insbesondere für pathologische Zwecke ihre weitere Anwendung wichtig erscheinen mußte. Doch versprechen die neben der chemischen Fragestellung auch in morphologischer Hinsicht zielenden Untersuchungen erst dann Erfolg, wenn zunächst festgestellt wird, wie sich die Nuclealfärbung zu den üblichen anderen Färbemethoden mit präformierten Farbstoffen verhält, bzw. ob durch die Hydrolyse im Präparat so erhebliche Veränderungen hervorgerufen werden, daß jede morphologische Deutung von vornherein aussichtslos wird. Deswegen ist der Zweck der vorliegenden Arbeit, an normalem Gewebe zu untersuchen, inwieweit durch die Hydrolyse Zerstörungen angerichtet werden, gleichzeitig sollte studiert werden, wie sich einzelne Zellbestandteile der verschiedensten Organe der Nuclealreaktion gegenüber verhalten, wobei besondere Aufmerksamkeit dem bisher noch wenig oder gar nicht untersuchten Zellbestandteilen geschenkt wurde, insbesondere dem Begriff Chromatin, dem Kernsaft und dem Nucleolus.

Methodik.

Zur Beantwortung unserer Fragen wurden Schnitte von Organen der Ratte, des Menschen und des Kaninchens benutzt.

Ratte. Herzmuskel, Leber, Niere, Milz, Lunge, Trachea, Zunge, Speicheldrüsen, Magen, Dünn- und Dickdarm, Rectum, Knorpel, Knochen, Kleinhirn, Großhirn, Rückenmark.

Mensch. Muskel und Fasciengewebe.

Kaninchen. Ovar und Ureter.

Die Vorbehandlung sämtlicher Präparate bis zur jeweiligen Färbung bzw. Reaktion war folgende: Fixation in

Sublimateisessig und Aceton, Härtung in der aufsteigenden Alkoholreihe und nach Vorbehandlung mit Xylol und Xylolparaffin Einbettung in Paraffin. Knorpel und Knochengewebe wurde in Celloidin eingebettet. Die mit dem Mikrotom hergestellten Paraffinschnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und gefärbt, die Celloidinschnitte mittels Glasspatel in die zu färbenden Flüssigkeiten übertragen und am Schluß auf einen Objektträger aufgezogen. (Die Präparate wurden in der histologischen Abteilung der hiesigen chirurgischen Klinik — Geh. Rat Prof. Dr. Küttner — hergestellt. Herrn Privatdozent Dr. Barthels spreche ich hiermit nochmals meinen ergebensten Dank für sein liebenswürdiges Entgegenkommen aus.)

Darauf folgte bei allen Präparaten die Deparaffinierung in Xylol und Fixierung in der absteigenden Alkoholreihe, jeweils 2 Minuten. (Absol., 96%, 70% Alkohol.)

Um bisher Bekanntes als Vergleichsobjekt zu haben, wurde bei Serie I der Präparate die gewöhnliche Hämatoxylin-Eosinfärbung ausgeführt:

Xylol	2	Minuten
Absteigende Alkoholreihe je	2	„
Hämatoxylin (Hansen)	15	„
Wasserspülung	10	„
Differenzierung in salzsaurem Alkohol	1	„
Wasserspülung	10	„
Eosin $^1/_4$%	1	„
Wasserspülung	3	„
aufsteigende Alkoholreihe und Karbolxylol jeweils	2	„

Serie II wurde der Nuclealreaktion unterworfen. Dazu sind als Reagenzien nötig:

n-Salzsäure,
fuchsinschweflige Säure,
SO_2-haltiges Wasser.

Zur Herstellung der fuchsinschwefligen Säure wurde 1 g zerriebenes Fuchsin in einem Erlenmeyerkolben mit 200 ccm kochenden Wassers eingetragen und etwa 5 Minuten lang geschüttelt. Nach Abkühlen der Farbstofflösung auf etwa 50° filtrierte man sie in ein mit Schliffstopfen versehenes Vorratsgefäß, versetzt mit 20 ccm n-Salzsäure,

kühlt dann durch Berieseln mit Wasser weiter bis auf etwa 25° ab und löst in der Farbstofflösung 1,0 g wasserfreies Natriumbisulfit pro analysi. Darauf bleibt die Flüssigkeit mindestens 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen.

Die fuchsinschweflige Säure erfordert einen gewissen Überschuß an SO_2, da sie sich sonst unter Rotfärbung zersetzt und SO_2 abdissoziiert. Dieser Überschuß an SO_2 ist andererseits in mäßigen Grenzen zu halten, da sonst die Empfindlichkeit des Reagenz leidet. Um ein stets gleichmäßiges Reagenz zu erhalten, wurde genau nach der von Feulgen angegebenen Vorschrift verfahren.

Da weiterhin schon eine starke Verdünnung des Reagenz eine Rotfärbung hervorruft, wurde zum Abspülen der Präparate nach Herausnahme aus der fuchsinschwefligen Säure nur SO_2-haltiges Wasser verwendet.

Herstellung nach Feulgen: 200 ccm Leitungswasser wurden mit 10 ccm einer 10% Lösung von wasserfreiem Natriumbisulfit und 10 ccm n-Salzsäure versetzt, die nach folgender Formel miteinander reagieren:

$$NaHSO_3 + HCl = NaCl + H_2O + SO_2.$$

Um das Entweichen der SO_2 zu verhindern, werden die mit dem SO_2-haltigen gefüllten Bechergläser mit Uhrschälchen bedeckt. Das SO_2-haltige Wasser ist täglich zu erneuern.

Die Ausführung der Nuclealreaktion gestaltet sich nun folgendermaßen: Aus dem 70%-Alkohol kam das Präparat in Wasser und dann ca. 10 Sekunden in kalte n-Salzsäure, dann sofort für 4 Minuten zur Hydrolyse in ein Becherglas, das 150 ccm n-Salzsäure enthielt und durch einen Brenner dauernd bei 60° Temperatur gehalten wird. Nach beendeter Hydrolyse folgte wiederum 10 Sek. langes Eintauchen in kalte n-Salzsäure, und eine etwa 5 Minuten dauernde Spülung nacheinander in 2 mit frischem Leitungswasser gefüllten Bechergläsern. Etwa noch anhaftende Wasserpartikel läßt man abtropfen und gibt das Präparat nun in die fuchsinschweflige Säure, in der es mehrere Stunden verbleibt. Die Säure befindet sich in einer Cuvette, die mit einem an den Rändern gut eingefetteten Glasdecke luftdicht verschlossen werden muß. Dann erfolgte die Spülung in 2 mit SO_2-haltigem Wasser gefüllten Bechergläsern, je 1 Minute lang, darauf noch eine Wasserspülung von 5 Minuten und Überführung in die aufsteigende Alkoholreihe. 70%, 96%, absol. Alkohol. Zum Schluß Karbolxylol, ebenfalls 2 Minuten

und Einbetten in Kanadabalsam. — Bezüglich weiterer Einzelheiten der Methodik und der zahlreichen Fehlerquellen, denen man bei Arbeiten mit fuchsinschwefliger Säure zum Opfer fallen kann, sei auf die Originalvorschrift von Feulgen verwiesen.

Um feststellen zu können, ob die Hydrolyse zerstörend wirkt, wurde bei einer dritten Serie von Schnitten die Nuclealreaktion nach der Hydrolyse unterbrochen und die Hämatoxylin-Eosinfärbung, angeschlossen, so daß sich an das Wasserbad nach der Hydrolyse die 15 Minuten lang dauernde Färbung mit Hämatoxylin anschloß usw.

Zur Erhaltung besseren Kontrastes färbten wir endlich eine IV. Schnittserie nach beendeter Nuclealreaktion 1 Min. mit $^1/_4$% Eosin nach.

Bewirkt nun die Hydrolyse wesentlichere Störungen im Aufbau des Kerns? Um dies zu studieren, wurde an die Hydrolyse nicht die Behandlung mit fuchsinschwefliger Säure, sondern die Färbung mit Hämatoxylin angeschlossen. Ein Vergleich dieser Präparate mit den Hämatoxylin-Eosinschnitten ohne vorausgegangene Hydrolyse mußte etwaige durch die Hydrolyse bedingte Veränderungen aufdecken. Das Ergebnis ist folgendes:

Die Größe der Kerne hatte sich nicht geändert, eine stärkere Quellung, die nach Berg zu einer allgemeinen Vergrößerung führen soll, ist uns nicht aufgefallen. Man gewinnt sogar den Eindruck, daß manche Kernbestandteile, so die von den Anatomen als „Chromatin" bezeichnete Substanz, sowie die einzelnen Bälkchen eher schärfer gegen die Grundsubstanz, abgesetzt waren, als im nicht hydrolysierten Präparat. Die Netzknoten boten in beiden Präparaten das gleiche Bild, vergrößert oder aufgelockert erschienen sie nie. Schwächer tingiert erschien die Kerngrundsubstanz. Die Nucleolen zeigten keine Veränderung der Größe und Form, auch ihnen war eher eine schärfere Zeichnung eigen. Von einer wesentlich zerstörenden Wirkung der Hydrolyse in der von uns angewandten milden Form kann also nicht die Rede sein, eine morphologische Deutung derartig vorbehandelter Organschnitte ist also bis zu einem gewissen Grade, soweit es sich wenigstens um den Kern handelt, noch durchaus möglich. — Wodurch die schärfere Zeichnung mancher Kernbestandteile nach der Hydrolyse und bei nachfolgender Hämatoxylin-Eosinfärbung bedingt ist, läßt sich nicht sicher sagen.

Bei der Nuclealreaktion ist die Hydrolyse ein wichtiger Faktor. Wenn wir nun gezeigt haben, daß sie in ihrer milden Form keine grundlegenden Veränderungen im Kernaufbau hervorruft, so darf man in gewissem Sinne auch in morphologischer Hinsicht an eine Deutung der nuclealpositiven Kernkomponenten herangehen und eine nachfolgende Kontrastfärbung zum Vergleich heranziehen.

Wie verhalten sich die Nuclealkörper nun zum Protoplasma, in welcher Beziehung stehen sie zu dem bisher üblichen Begriff des Chromatins, der Kerngrundsubstanz und dem Nucleolus? Zunächst konnten wir den Befund Feulgens bestätigt finden, daß nur die Kerne der Zellen nuclealpositiv sind; das Protoplasma zeigte sich negativ. Lediglich der Zelleib der großen Ganglienzellen im Rückenmark war in vielen Fällen wenn auch schwach, so doch deutlich blaustichig tingiert. Ganglienzellen haben einen hohen Lipoidgehalt, es liegt also möglicherweise hier eine Plasmalreaktion vor. Wir müßten annehmen, daß trotz der Alkoholvorbehandlung nicht alles Plasmalogen restlos entfernt wurde. In der Tat konnte auch Imhäuser nachweisen, daß die Gewebe des Zentralnervensystems besonders reich an Plasmalogen sind. Groß- und Kleinhirnganglienzellen wiesen diese Anfärbung nicht auf.

Ebenfalls im Rückenmark stießen wir bei vielen großen Ganglienzellen auf im Cytoplasma gelegene, rundliche bis vieleckige, stark blauviolett gefärbte, im Vergleich zu dem nachher zu beschreibenden sehr zarten Nuclealgerüst, ziemlich grobe Granula, die vielleicht identisch sind mit den bereits von Redenz, allerdings unter anderen Versuchsbedingungen, als nuclealpositiv beschriebenen Nissl'schen Granula. Groß- und Kleinhirn zeigten diese Granula nicht.

Als das einzige bisher gefundene Gewebe halten die elastischen Fasern nach Alkoholbehandlung das Plasmal fest. Auch wir fanden es in den Wänden der Alveolen, der Milzkapsel und am deutlichsten in einem Gefäßschnitt, in dem es in vier breiten, stark blauviolett tingierten Schichten, durch Muskellagen getrennt, übereinander lag.

In vielen Eiern des Kaninchenovars fanden sich keine Kerne, die einzige scheinbare Ausnahme einer nuclealnegativen Reaktion des Kernes in unseren Präparaten. Es war allerdings nur der Fall bei den reifen, bereits bis zum Stadium des Graafschen Follikels gelangten Eiern. Die unreifen in den Primärfollikeln zeigten positive Reaktion. Dies ent-

spricht der bereits von Feulgen vertretenen Ansicht, daß eine Nuclealreaktion dann nicht zustande kommen kann, wenn die Nuclealstoffe in derart geringer Konzentration vorhanden sind, daß eine Reaktion eben nicht auslösbar ist, also unter der Schwelle liegt. Dies ist bei den reifen nicht befruchteten Eiern, bei denen die Kernsubstanz an Menge zurücktritt, der Fall.

Von besonderem Interesse ist natürlich das Verhalten der Nuclealkörper im Kern. Welche bereits bekannten Bestandteile desselben ergeben eine positive Nuclealreaktion, und welche Unterschiede bestehen gegenüber unserem Vergleichsobjekt, dem Hämatoxylin-Eosinpräparat? Bei letzterem kommt es nur an den Stellen, wo die Materie die chemischen oder physikalischen Bedingungen enthält zum Haften des Farbstoffs. Viele Forscher nehmen an, daß hierbei eine Nucleinsäure als saures Prinzip für das Haften des basischen Farbstoffs in salzartiger Form verantwortlich zu machen ist; mit rein morphologischen Gebilden schlechthin werden wir also auch dabei nicht zu tun haben. Doch kann man diese „Basophilie" des Zellkerns nicht als einen Nachweis einer Nucleinsäure in chemischem Sinne bezeichnen, denn die sauren Gruppen sind in der Biochemie nichts besonders charakteristisches. Zahlreiche biochemische Stoffe verhalten sich bekanntlich wie Säuren und manchmal hat der saure Charakter zur Folge, daß Färbungen mit basischen Farbstoffen zustande kommen, auch wenn sie keine Nucleinsäuren enthalten. Es sei hier nur an den Schleim, die Dottersubstanz der Eier und das Knorpelgewebe erinnert. Vor allem aber ist die Anfärbbarkeit des Zellkerns nichts absolut elektives, nicht etwas, was den Kern absolut vom Protoplasma unterscheidet. Man kann nämlich, wenn man will, wohl mit allen basischen Farbstoffen ein mikroskopisches Präparat überfärben, so daß auch das Protoplasma oder andere Elemente Farbstoff annehmen. Man tut dies zwar nicht oder differenziert nach dem Überfärben; aber die Auswahl einer bestimmten „Gradation" ist doch etwas Willkürliches, etwas, was in unserem Belieben steht und nichts Absolutes. Man tut es aber, um den Kern als morphologisches Gebilde vom Protoplasma abzuheben, von mikroskopisch-chemischem Nachweis von Nucleinsäure in streng chemischem Sinne ist dabei nicht die Rede. (Feulgen.)

Vor 50 Jahren hat Flemming den chemisch vollkommen nichtssagenden Begriff „Chromatin" für die im

Zellkern färbbaren Substanzen eingeführt: „Mit Chromatin soll nur bezeichnet sein: Diejenige Substanz im Zellkern, die bei den als Kerntinktionen bekannten Behandlungen den Farbstoff aufnimmt." Er führt weiter aus: „Dann vermeide ich auch einstweilen Beziehungen zu dem Namen Nuclein, so lange wir nicht wissen, ob diese Verbindung überhaupt im Kern bestimmt lokalisiert und an gewisse morphologische Bestandteile gebunden ist." Diese Unklarheiten in bezug auf den chemischen Aufbau des Kernes sind eigentlich die nachfolgenden Jahrzehnte geblieben, wenn auch Heidenhain 1907 neben der Basophilie die Oxyphilie von Kernsubstanzen, vor allem des Nucleolus beschrieb.

Vergleichen wir nun das Resultat der Nuclealreaktion mit der Kernfärbung durch Hämatoxylin-Eosin, so fällt von vornherein die große Ähnlichkeit der optischen Bilder auf. Wir finden als Abgrenzung jeden Kernes gegen das Protoplasma die „Membran". Sie weist in ihrem Verlaufe keinerlei Unterbrechungen auf; an manchen Stellen erscheint sie breiter, an anderen ist sie schmäler, immer ist sie deutlich nuclealpositiv.

Die Kerngrundsubstanz reagiert gleichfalls nuclealpositiv; sie zeigt sich vom schwächsten hellblau-violett bis zum stärksten dunkelblau-violett tingiert. Schwach erscheint die Reaktion in den Kernen der großen Ganglienzellen des Groß- und Kleinhirns, im letzteren besonders in den Purkinje-Zellen und in den Epithelien des Magen-Darmtraktus. Eine relativ starke Reaktion dagegen zeigten die Kerne der Körnerschicht des Kleinhirns. Die Dichtigkeit der Reaktion war in den einzelnen Kernen verschieden stark, so zeigten die Randpartien an Membran und Nucleolus einen stärkeren Farbton. Dies war ganz besonders schön bei den Kernen der Körnerschicht im Kleinhirn der Fall. Hierbei muß allerdings betont werden, daß der Eindruck, ob die Reaktion „stark" oder „schwach" ausfällt, vorwiegend bedingt ist durch die Verdünnung, die die Nuclealkörper in großen Zellen, wo sie auf verhältnismäßig große Fläche verteilt sind, erfahren. Bei dem Verhalten der Eizelle wurde bereits darauf verwiesen.

Ausgesprochen stärker reagierend und deutlich sich abhebend, durchzieht die Grundsubstanz ein Gerüstwerk von unregelmäßig-netzartig angeordneten Bälkchen, die von der Membran direkt oder von einer unregelmäßig verdickten Stelle derselben ausgehen. In ihrem Verlaufe werden sie oft

von im Vergleich zu ihrer Stärke ziemlich groben, meist vieleckig gestalteten Anschwellungen unterbrochen, von denen neue Bälkchen ausgehen, die ihrerseits wiederum zur nächsten stärkeren Ansammlung von Nuclealsubstanz bzw. zu einem anderen Bälkchen hinziehen oder auch, wie es manchmal zu sehen ist, frei in der Grundsubstanz endigen. Die Stärke der Bälkchen ist in demselben Kern öfter eine ungleiche; sie erscheinen kompakt und in ihrem Substanzverlauf nicht unterbrochen. Dieses eben beschriebene „Nuclealgerüst" entspräche in seinem strukturellen Aufbau den Grundzügen des bisherigen „Chromatingerüstes" der Histologie.

In allen Schnitten kann man aber beobachten, daß zwischen Nuclealfärbung und Hämatoxylin-Eosinfärbung insofern ein Unterschied zu bestehen scheint, als Kernmembran und Nuclealgerüst bei ersterer Färbung schmäler und feiner ziselierter sind. Man gewinnt den Eindruck, als ob das, was man bisher als Membran bzw. Chromatingerüst bezeichnete, mehr ist als der mit der Nuclealreaktion nachgewiesene Anteil. Wir können ja bisher nur diesen einen Typ von Nucleinsäure nachweisen, und es ist sehr wahrscheinlich, daß weitere charakteristische Typen von Nucleinsäuren den Kern aufbauen helfen, nämlich solche, die wir bisher noch nicht spezifisch durch eine Reaktion nachweisen können, sondern nur unspezifisch durch die Anfärbung mit basischen Farbstoffen, sie sind es wohl, die den „Substanzverlust durch die Hydrolyse" (Feulgen) ausmachen.

Der Nucleolus fand sich in allen Kernen deutlich nuclealpositiv, insofern als seine äußere Begrenzung, „die Chromatinschale" wie sie von Heidenhain bisher genannt wurde, deutliche Nuclealreaktion zeigte. Zu dieser Schale streben Bälkchen des Nuclealgerüstes hin und vereinigen sich mit ihr direkt oder in Form von stärkeren Anschwellungen der Nuclealkörper. In ihrer Stärke entspricht die Schale etwa der Membran des Kernes und ist ebenso wie diese in ihrem Verlauf continuierlich. Am deutlichsten war sie in den Purkinje-Zellen zu beobachten, da hier — wie vorher beschrieben — die Grundsubstanz sehr wenig oder gar nicht reagiert und deshalb die positive Begrenzung des Nucleolus besonders kontrastreich wirkt. In dieser Zellart reagiert der Nucleolusinhalt gar nicht oder äußerst schwach. Das Gegenteil ist der Fall bei den meisten anderen Nucleolen. Deren Inhalt reagiert positiv, und zwar

ist die Tinktion diffus, aber bedeutend schwächer als die der „Schale", doch im allgemeinen stärker als die der Kerngrundsubstanz.

Ungewöhnlich starkes Lichtbrechungsvermögen wird als Kennzeichen des Nucleolus angesehen. Vielleicht ist seine im Vergleich zur Grundsubstanz stärkere Anfärbung bei der Nuclealreaktion auf dieses Phänomen zurückzuführen. Daß aber der Nucleolusinhalt Nuclealkörper enthält, dürfen wir nach diesen Untersuchungen als sicher annehmen. Voß gelangt zur gleichen Auffassung, während Wermel die positive Reaktion der Nucleolen auf technische Fehler zurückführt. Dies erscheint unwahrscheinlich, da wir zu Beginn unserer Arbeit zeigen konnten, daß die Hydrolyse, die den Anlaß zu Fehlurteilen geben könnte, nicht den schwerwiegenden Eingriff für das Gewebe bedeutet, den man bisher gemeinhin annahm.

Ein Vergleich mit der Hämatoxylin-Eosinfärbung gibt bezüglich des Verhaltens des Nucleolus den gleichen Eindruck wie bei den übrigen Kernkomponenten: Feiner, ziselierterer Aufbau der Chromatinschale und schwächere Tinktion des Inhaltes bei der Nuclealreaktion, gröbere Zeichnung und stärkere Anfärbung bei der Hämatoxylin-Eosinfärbung. Als bewiesen kann damit gelten, daß der Nucleolus von einer Schale umgeben ist, die zum größten Teil aus Thymonucleinsäure besteht, und die mit dem Nuclealgerüst im Zusammenhang steht. Der Inhalt enthält in den meisten Fällen ebenfalls Nuclealsubstanz.

Vergleicht man das quantitative Vorkommen der Nuclealkörper nach den einzelnen Keimblättern, so läßt sich für keines ein bestimmter Vorrang einräumen, der Gehalt ist vielmehr unter den Kernen einzelner Gewebsarten unter Umständen ein durchaus verschiedener.

Ektoderm:

Die Kerne der Purkinje-Zellen und die der Ganglienzellen vom Vorderhorn des Rückenmarks enthalten am wenigsten Nuclealkörper, doch finden wir im gleichen Gewebe die Kerne der Körnerschicht äußerst intensiv nuclealpositiv für alle ihre Komponenten. Die Molekularschicht des Kleinhirns enthält wieder bedeutend weniger Thymonucleinsäure. Diese Unterschiede sind auch in den übrigen Kernen des Großhirns und Rückenmarks deutlich zu finden. Zunge vergl. Entoderm!

Mesoderm:

An erster Stelle steht hier der Lymphozyt, der gut in der Milz zu studieren ist. Er zeigt eine über den ganzen Kern verteilte diffuse Reaktion. Von einem Nuclealgerüst oder Nucleolus ist nichts zu sehen. An den Lymphozyten reiht sich das Bindegewebe. Seine Kerne reagieren auffallend stark, aber auch hier haben sie unter sich wieder verschieden starke Reaktion, ohne Rücksicht auf die Art des Bindegewebes. Bedeutend schwächer in der Reaktion sind Muskulatur, Knorpel und Knochen; in ihrer Stärke gleichen sie untereinander.

Entoderm:

Die Kerne der Epithelien des gesamten Magen-Darmtraktus zeigen durchweg einen geringen bis mittleren Gehalt an Thymonucleinsäure. Die Kernmembran ist zwar immer stark nuclealpositiv, im allgemeinen auch der Nucleolus, wenig Tinktion weist aber das Gerüst und die Grundsubstanz auf. Stärker im Vergleich zu letzteren reagieren die Leberzellkerne in allen Komponenten. Mit wenig Unterschied folgen ihnen die Epithelien der Lunge und Trachea. Das Plattenepithel der Zunge zeigt sich in seinen Grundschichten stark positiv. Hier sind die Kerne klein und eng aneinander gedrängt. Nach den oberen Schichten zu nimmt mit Größerwerden der Zelle und damit auch des Kerns der Gehalt an Thymonucleinsäure anscheinend ab. Man gewinnt immer wieder den Eindruck, selbst unter Berücksichtigung der schon erwähnten Erscheinung des Schwächerwerdens der Nuclealreaktion bei diffuserer Anordnung der Nuclealkörper in größeren Kernen, daß doch in quantitativer Hinsicht gewisse Unterschiede bestehen, insofern als es Kerne zu geben scheint, die besonders reich an Thymonucleinsäure sind, während andere weniger Gehalt an Nuclealkörpern aufweisen.

Zusammenfassung.

Studien über das Verhalten der Thymonucleinsäure an pathologisch veränderten Geweben wurden bisher nur vereinzelt angestellt, trotzdem derartige Untersuchungen von Bedeutung für manche pathologische Zustände sein können, nicht zuletzt beispielsweise für Tumorgewebe. Daß der Pathologe bisher nur selten die Nuclealreaktion zu histologischen Studienzwecken heranzog, liegt wohl weniger an der vielleicht etwas komplizierteren Technik, als vielmehr ganz besonders daran, daß bisher nur wenig Untersuchungen vorliegen, die sich damit befassen, den Ausfall der Nuclealreaktion in den verschiedensten Geweben zu studieren und sie zu den übrigen in der Histologie üblichen Färbemethoden mit präformierten Farbstoffen in Beziehung zu setzen. Es war daher Zweck dieser Arbeit, unter Berücksichtigung der in der Literatur niedergelegten Angaben (Feulgen, K. Voit, Voß, Wermel, Berg usw.) das Verhalten der verschiedensten Gewebe gegenüber der Nuclealreaktion zu untersuchen und gleichzeitig zu erforschen, ob und inwieweit Vergleiche zwischen Präparaten, die mit der Nuclealreaktion und solchen, die mit echten Färbemethoden behandelt werden, zulässig sind. Hierfür ist Voraussetzung, daß die für die Anstellung der Nuclealreaktion notwendige saure Hydrolyse den Zellkern nicht wesentlich morphologisch verändern durfte. Es konnte gezeigt werden, daß dies in der Tat auch nicht der Fall ist; man gewinnt sogar im Gegenteil den Eindruck, daß manche Zellkernstrukturen bei der Hydrolyse und nachfolgender Färbung mit Farbstoffen schärfer und klarer zum Ausdruck kommen als ohne vorausgegangene Hydrolyse. Herrn Priv.-Doz. Dr. Kuhlenbeck vom hiesigen anatomischen Institut, der die Liebenswürdigkeit hatte, einzelne Schnitte durchzusehen, sei auch an dieser Stelle nochmals ergebenst gedankt. Somit darf angenommen werden, daß eine wesentliche Zerstörung von Kernmaterial durch die Hydrolyse nicht stattfindet. Weitere eingehendere Untersuchungen ergaben, daß der Nucleolus als nuclealpositiv bezeichnet werden muß, daß er also eine Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure enthält. In Übereinstimmung mit den Versuchsergebnissen von Feulgen und seinen Schülern konnte dann weiter festgestellt werden, daß sämtliche untersuchten Gewebe nuclealpositive Kerne enthalten. Gewisse quantitative Unterschiede einzelner Kerne bezüglich des Gehaltes an

Nuclealkörpern scheinen zu bestehen, selbst wenn man berücksichtigt, daß in größeren Kernen durch die lockere Verteilung der Nuclealkörper die Reaktion an sich schwächer ausfällt. Der Vergleich mit den in der Histologie üblichen Färbemethoden zeigt, daß das nucleale Kernbild weitgehende Ähnlichkeit mit einem durch echte Färbung gewonnenen aufweist, daß aber andererseits der Begriff des „Chromatins" sich nicht ausschließlich mit dem der Nuclealkörper deckt. Ganz zweifellos färben sich mit basischen Farbstoffen auch noch andere, nicht als Thymonucleinsäure anzusprechende Substanzen an, da die Nuclealfärbung im allgemeinen eine wesentlich feinere und zartere Kernstruktur zeigt, und, wie schon Feulgen nachwies, öfters im Kern wie ausgestanzt wirkende Lücken zu beobachten sind, die bei der Färbung mit basischen Farbstoffen in dieser Schärfe nicht hervortreten. Die Untersuchungsergebnisse sprechen durchaus dafür, daß es sehr wohl möglich erscheint, auch an pathologischen Geweben Studien über das Verhalten der Thymonucleinsäure unter gleichzeitiger Heranziehung der üblichen Färbemethoden mit präformierten Farbstoffen anzustellen.

Literaturverzeichnis

W. Berg: Zeitschrift für mikrosl. anat. Forschung, Bd. VII S. 421; 1926.

R. Feulgen: Die Nuklealfärbung bei E. Abderhalden: Hdb. d. biolog. Arbeitsmethoden. Abtl. 5. Teil 2. 1055 (dort weitere Literatur).

R. Feulgen und K. Voit: Ztschr. für physiol. Chemie 135, 203, 1924.

R. Feulgen und K. Voit: ebenda 137, 272, 1924.

R. Feulgen und K. Imhäuser: Ztschr. für physiol. Chemie 148, 1, 1925.

R. Feulgen und K. Rossenbeck: Ztschr. f. physiol. Chemie 135, 203, 124.

R. Feulgen und K. Voit: Pflügers Archiv 206, 389, 1924.

F. Feulgen-Brauns: Pflüger's Archiv 203, 415, 1924.

K. Imhäuser: Bioch. Ztschr. 186, S. 360, 1927.

E. Redenz: Verh. d. phys. med. Ges. zu Würzburg, Bd. 40, S. 220, 1924.

W. Stepp, R. Feulgen und K. Voit: Biochem. Ztschr. 1927, 181, S. 284.

K. Voit und G. Kochmann: Fol. Haematologica Bd. 39 S. 496, 1930.

K. Voit: Arch. f. experim. Path. u. Pharmakol. 122, S. 66, 1927.

K. Voit: Ztschr. f. d. ges. experim. Med. 47, 183, 1925.

K. Voit: Ztschr. f. d. ges. experim. Med. 55, 564; 1927.

H. Voß: Kli. Wo. 1929, Bd. 19, S. 887.

H. Voß: Ztschr. f. Anatomie u. Entwicklungsgesch. 95, S. 712, 1931.

E. Wermel: Ztschr. f. Zellforschung. Bd. 5, S. 400, 1927.

E. Wermel und D. Sassuchin: Ztschr. f. Zellforsch. und mikroskop. Anatomie, 6, S. 424; 1927.

M. Westhues: Beitr. z. path. Anat. u. Allg. Pathol. 75, 603, 1926.

Lebenslauf

Ich, Erich Balzer, bin geboren am 9. 10. 1906 zu Preiswitz, Kreis Gleiwitz, Oberschlesien, als Sohn des damalig praktischen Arztes Dr. med. Franz Balzer und seiner Ehefrau Hedwig, geb. Bannes. Nach dem Besuch der Volksschule absolvierte ich das Humanistische Gymnasium zunächst in Rybnik, dann in Gleiwitz, wo ich im Frühjahr 1925 mein Abitur bestand. Darauf studierte ich Medizin an den Universitäten München, Erlangen, Wien, Kiel und Breslau. Das Physikum machte ich nach dem Sommersemester 1927 in Erlangen, das Staatsexamen beendete ich in Breslau im August 1930. Die ersten 5 Monate meines Medizinalpraktikantenjahres arbeitete ich an der Medizinischen Universitäts-Klinik zu Breslau, Prof. Dr. Stepp, die übrigen an der III. med. Klinik in Hamburg-Eppendorf unter Prof. Dr. Schottmüller.

Erich Balzer.